昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2006，49(5)：740－746　　ISSN 0454-6296

烟实夜蛾触角化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达

蒋金炜[1]，高素霞[1]，安世恒[1]，王琛柱[2]

(1. 河南农业大学植物保护学院，郑州 450002；2. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080)

摘要：利用 RT-PCR 技术扩增了编码烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* 触角化学感受蛋白(chemosensory protein)的全长 cDNA。克隆和测序结果表明，烟实夜蛾化学感受蛋白基因核苷酸序列全长 384 bp(GenBank 序列号：DQ285667)，编码 127 个氨基酸残基，预测 N-末端包含 16 个氨基酸组成的信号肽序列，因此估测其成熟蛋白分子量为 12.97 kD，等电点为 5.32。将该基因重组到表达载体 pGEX-4T$_2$ 中，并转入原核细胞中进行表达。SDS-PAGE 和 Western 印迹分析表明，经 IPTG 诱导后，烟实夜蛾化学感受蛋白基因能在大肠杆菌 BL21 中表达，电泳检测到一条约 39 kD 的外源蛋白，与预测的融合蛋白分子量大小相符。

关键词：烟实夜蛾；化学感受蛋白；基因克隆；测序；原核表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2006)05-0740-07

Cloning and sequencing of cDNA encoding a chemosensory protein in the antenna of *Helicoverpa assulta* and its expression in *Escherichia coli*

JIANG Jin-Wei[1]，GAO Su-Xia[1]，AN Shi-Heng[1]，WANG Chen-Zhu[2] (1. College of Plant Protection，Henan Agricultural University，Zhengzhou 450002，China；2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents，Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing 100080，China)

Abstract：The full-length cDNA encoding a chemosensory protein (CSP) was isolated from the antenna of *Helicoverpa assulta* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). This PCR fragment was further cloned and sequenced. The results showed that the CSP gene in *H. assulta* was 384 bp in size (registered in GenBank with the accession number DQ285667) and encoded 127 amino acid residues. The N-terminus hydrophobic region predicted containing of 16 amino acid residues within the Has-CSP displayed the characteristic features of a signal peptide. Thus the predicted mature weight (MW) is 12.97 kD and isoelectric point (IP) 5.32. The CSP gene was then constructed into the expression vector pGEX-4T$_2$ for overexpression in prokaryotic cells. The SDS-PAGE analysis indicated that the CSP gene was expressed in *Escherichia coli* BL21. The Western blot further confirmed this result. The expressed fusion protein in BL21 was found to be about 39 kD，consistent with the predicted result.

Key words：*Helicoverpa assulta*；chemosensory protein；gene cloning；sequencing；prokaryotic expression

昆虫在长期进化过程中，发展演变了复杂的化学信息感受机制，在觅食、寻偶和产卵等行为中，通过敏锐的嗅觉、味觉和触觉等功能，感受各种环境化学因子的刺激，进行精巧的化学通讯，适应环境选择，保持种群繁衍(Pilpel and Lancet，1999)。在昆虫对环境化学因子刺激感受的过程中，在诸多与行为有关的蛋白中，昆虫化学感受蛋白(chemosensory proteins，CSPs)尤其值得关注。昆虫化学感受蛋白几乎遍布昆虫的所有感受器，在感受、溶解、运输、传导环境化学刺激因子方面具有重要作用(刘金香等，2005)。深入研究昆虫化学感受蛋白，有利于揭示昆虫与环境中化学信息联系的本质，了解昆虫对环境

基金项目：农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放研究基金资助项目(ChineseIPM0503)

作者简介：蒋金炜，男，1956 年 1 月生，河南荥阳人，副教授，研究方向为害虫综合治理，E-mail：jiangjw78@163.com

收稿日期 Received：2006-02-22；接受日期 Accepted：2006-07-14

化学因子刺激的感受机制，有助于探究有害昆虫治理和资源昆虫利用的途径。

铃夜蛾属 *Helicoverpa* 的多种昆虫，如棉铃虫 *H. armigera*、谷实夜蛾 *H. zea* 和烟实夜蛾 *H. assulta* 是世界性的农业大害虫。棉铃虫和谷实夜蛾的寄主植物范围很广，是典型的多食性昆虫，而烟实夜蛾的食性较窄，是寡食性的昆虫。Wang 等（2005）从比较脱饱和酶的角度，提出烟实夜蛾较原始，棉铃虫和谷实夜蛾较进化，而尤以棉铃虫更为进化的观点。有关谷实夜蛾和棉铃虫的化学感受蛋白及其基因已有研究报道（王桂荣等，2005），但烟实夜蛾的尚未见报道。为从昆虫化学感受蛋白的基因序列比较铃夜蛾属几种昆虫间的进化关系，作者就烟实夜蛾化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达进行了研究。

1　材料和方法

1.1　材料

供试昆虫：烟实夜蛾幼虫在本实验室用人工饲料饲养，成虫羽化后 3 天剪下雌雄虫触角及下唇须用于提取总 RNA。

菌种及质粒：pGEM-T Easy 载体购自 TaKaRa 公司，大肠杆菌 JM109 和 BL21（DE3）、质粒 pGEX-$4T_2$ 均为本实验室保存。

主要试剂及工具酶：总 RNA 抽提试剂 RNAiso Reagent、用于 RT-PCR 的 One Step RNA PCR Kit、质粒小样快速抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ及蛋白质分子量标准均购自 TaKaRa 公司，辣根过氧化物酶底物 DAB 以及鼠抗 GST 单抗购自 BBI 公司，辣根过氧化物酶标记的二抗购自华美生物工程公司，X-gal、IPTG、丙烯酰胺及 N，N′-甲叉双丙烯酰胺试剂由 Sangon 公司生产，硝酸纤维素膜（NC）购自 Promega 公司，其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 的提取：将剪下的烟实夜蛾触角及下唇须各 30 对，分别放入无 RNAase 的 1.5 mL 离心管中，匀浆后加入 1.0 mL 的 RNAiso Reagent 试剂，按照 TaKaRa 公司使用说明提取总 RNA。RNA 沉淀溶解于 50 L RNAase 的去离子水中，-20℃保存。

1.2.2　引物设计：根据 GenBank 中已登录的其他昆虫的化学感受蛋白基因序列（棉铃虫和谷实夜蛾的 GenBank 登录号分别为 AF368375 和 AF448448）设计并合成引物：

正向引物：5′-AGGATCCATGAAAGTCCTGCTAGTACT-3′

反向引物：5′-ACTCGAGTTATTCGGGGATCTGAATG-3′

为了便于将目的基因克隆到表达载体上，在正向、反向引物中分别设计了 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ酶切位点（以下划线表示）。以上引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3　RT-PCR 反应：反应体系为 50 μL，10 × Buffer 5 μL，dNTP mixture 5 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）10 μL，RNase 抑制剂 1 μL，AMV RTase XL 1 μL，AMV-Optimized Taq 1 μL，RNA 3 μL，正向引物和反向引物各 2 μL，RNase Free dH_2O 20 μL，放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为 50℃ RT 反应 30 min，94℃预变性 3 min 后，94℃变性 1 min，58℃退火 1 min，72℃延伸 2 min，共进行 30 个循环，最后 72℃延伸 10 min。扩增完毕后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4　PCR 产物的克隆和鉴定：将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体后，进行蓝白斑筛选，挑选一白色菌落，培养过液后，参照 TaKaRa 公司提供的方法提取质粒，然后用 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ酶切鉴定。

1.2.5　序列测定和分析：DNA 的序列测定在 TaKaRa 公司进行。

1.2.6　重组表达载体的构建：将重组的 pGEM-T/Has-CSP 经 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切后，回收 400 bp 左右的片段，与经同样酶切的原核表达载体 pGEX-$4T_2$ 连接。在 T4 连接酶的作用下于 14℃连接过夜。同时转化大肠杆菌 JM109，过夜培养，然后进行重组表达载体的转化及重组质粒的双酶切鉴定。

1.2.7　外源基因的诱导表达：提取经初步鉴定的质粒，转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞，然后涂平板过夜培养。挑取单菌落于 10 mL 含有氨苄的 LB 培养基中，7 个重复，振荡培养至 OD_{600} 达 0.3 左右，分别加入不同浓度的 IPTG（异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷），28℃ 140 r/min 诱导过夜。收集菌液，每个离心管中倒入 1.5 mL 诱导过的菌，离心弃上清液，重复操作一次（为了增加蛋白量），在每管沉淀中加入 100 μL PBS 悬浮菌，等量的 2 × SDS-PAGE Loading Buffer（0.1 mol/L Tris-HCl pH 6.8，20% 甘油，4% SDS，0.05‰溴酚蓝，10% 巯基乙醇）混匀，在沸水中煮 10 min，12 000 × g 离心 2 min，-20℃保存备用。

1.2.8　SDS-PAGE：10% 分离胶：ddH_2O 4 mL，30%

丙烯酰胺 3.3 mL，Tris-HCl（pH 8.8）2.5 mL，10% SDS 100 μL，10%过硫酸铵 100 μL，TEMED 8 μL。浓缩胶：ddH$_2$O 1.7 mL，30%丙烯酰胺 0.75 mL，Tris-HCl（pH 6.8）0.5 mL，10% SDS 40 μL，10%过硫酸铵 40 μL，TEMED 4 μL。

1.2.9　Western 印迹分析：Western 印迹分析参照 Sambrook 等（1989）方法。具体操作如下：首先将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到硝酸纤维素膜上，然后用封闭液（PBST + 5%脱脂奶粉）封闭 1 h，接着用 PBST + 5%脱脂奶粉 + 鼠抗 GST 2 μL，室温反应 1.5 h，用 PBST 洗 3～6 次，加入封闭液和辣根过氧化酶标记的羊抗鼠的二抗，室温反应 1.5 h，用洗脱液洗膜 3 次；最后将纤维素膜置于含有 DAB 的显色液中至条带清晰，将膜放入蒸馏水终止显色反应。

1.2.10　融合蛋白可溶性检测：取大肠杆菌诱导培养的菌液，4℃ 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。每 300 μL 培养物细胞沉淀悬于 150 μL PBS。加入溶菌酶至终浓度 0.5 g/L，冰上放置 30 min，反复冻融几次后，用针筒将 30 μL 0.2%的 Triton X-100 注入粘的细胞裂解物中，剧烈振荡数次混匀。4℃振荡温育 15 min。5 000 r/min 离心 20 min，去除不溶性细胞碎片。将上清液和沉淀分别处理后进行 SDS-PAGE 检测。

2　结果与分析

2.1　烟实夜蛾触角化学感受蛋白基因的扩增和克隆

以烟实夜蛾不同组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增后，利用琼脂糖凝胶电泳分析，结果得到 384 bp 左右的特异性 PCR 条带（图 1）。将目的片段与 pGEM-T Easy 载体用 T4 DNA 连接酶连接，用氯化钙法转化大肠杆菌 JM109，并在带有 Ampicillin、X-gal、IPTG 的 LB 平板上根据蓝白斑筛选阳性重组子，然后用 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切鉴定克隆结果。

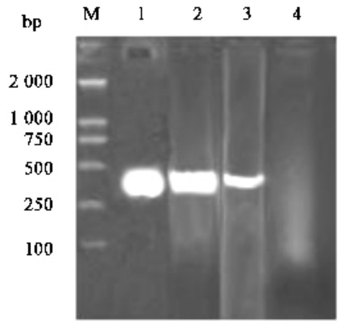


图 1　烟实夜蛾不同组织化学感受蛋白基因的 PCR 产物

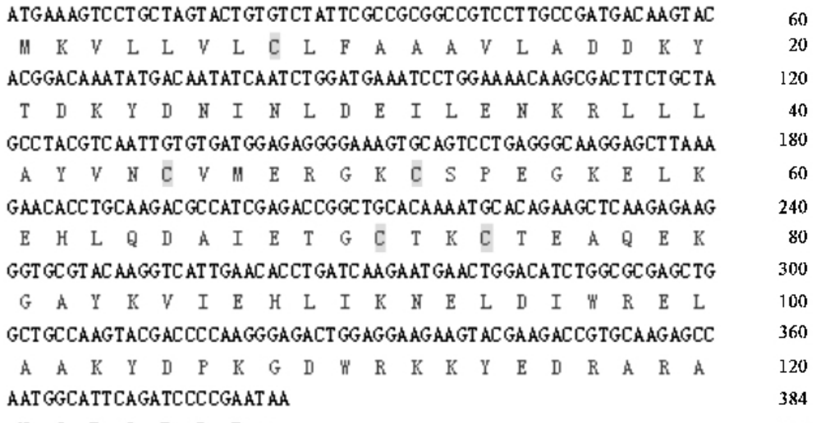
Fig. 1　PCR product of chemosensory protein gene in different tissues of *Helicoverpa assulta*

M：标准分子量 Molecular weight marker DL2000；1. 触角 cDNA 作为模板 cDNA from antennae as template；2. 幼虫头 cDNA 作为模板 cDNA from head as template；3. 下唇须 cDNA 作为模板 cDNA from underlip palp as template；4. PCR 阴性对照 PCR without template.

2.2　序列测定结果和同源性分析

烟实夜蛾触角化学感受蛋白 cDNA 全长基因的核苷酸序列如图 2 所示，翻译的氨基酸序列位于核苷酸序列之下，阴影内为保守的半胱氨酸作用位点。该序列已在 GenBank 中登录，序列号为 DQ285667。

序列测定的结果表明，烟实夜蛾化学感受蛋白基因开放阅读框全长 384 bp，编码 127 个氨基酸残基，其中前 16 个氨基酸是信号肽序列（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP），利用 EXPASY server（www.expasy.ch）预测成熟蛋白分子量为 12.97 kD，



```
ATGAAAGTCCTGCTAGTACTGTGTCTATTCGCCGCGGCCGTCCTTGCCGATGACAAGTAC   60
 M  K  V  L  L  V  L  C  L  F  A  A  A  V  L  A  D  D  K  Y    20
ACGGACAAATATGACAATATCAATCTGGATGAAATCCTGGAAAACAAGCGACTTCTGCTA  120
 T  D  K  Y  D  N  I  N  L  D  E  I  L  E  N  K  R  L  L  L    40
GCCTACGTCAATTGTGTGATGGAGAGGGGAAAGTGCAGTCCTGAGGGCAAGGAGCTTAAA  180
 A  Y  V  N  C  V  M  E  R  G  K  C  S  P  E  G  K  E  L  K    60
GAACACCTGCAAGACGCCATCGAGACCGGCTGCACAAAATGCACAGAAGCTCAAGAGAAG  240
 E  H  L  Q  D  A  I  E  T  G  C  T  K  C  T  E  A  Q  E  K    80
GGTGCGTACAAGGTCATTGAACACCTGATCAAGAATGAACTGGACATCTGGCGCGAGCTG  300
 G  A  Y  K  V  I  E  H  L  I  K  N  E  L  D  I  W  R  E  L   100
GCTGCCAAGTACGACCCCAAGGGAGACTGGAGGAAGAAGTACGAAGACCGTGCAAGAGCC  360
 A  A  K  Y  D  P  K  G  D  W  R  K  K  Y  E  D  R  A  R  A   120
AATGGCATTCAGATCCCCGAATAA                                      384
 N  G  I  Q  I  P  E  *                                       127
```

图 2　烟实夜蛾化学感受蛋白基因的核苷酸序列及相应的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide and deduced amino acid sequence of chemosensory protein gene of *Helicoverpa assulta*

等电点为 5.32。该蛋白质具有化学感受蛋白的一些特征，序列中有 5 个保守的半胱氨酸位点。

利用 BLAST 对烟实夜蛾化学感受蛋白的同源蛋白进行搜索，对搜索的结果进行氨基酸序列的多重联配和进化分析。多重序列联配的结果表明：在化学感受蛋白的氨基酸中有 18 个氨基酸是完全保守的，暗示着这些氨基酸残基对维持化学感受蛋白的功能起着重要的作用。同时 5 个与功能有关的保守半胱氨酸位点在不同昆虫中化学感受蛋白的位置是一致的(图 3)。烟实夜蛾与其他十几种昆虫的化学感受蛋白基因有高度的同源性，其中与棉铃虫和谷实夜蛾的序列一致性可达到 98%，从一定程度上表明亲缘关系越近，化学感受蛋白基因间的核苷酸和氨基酸序列同源性越高(图 4)。

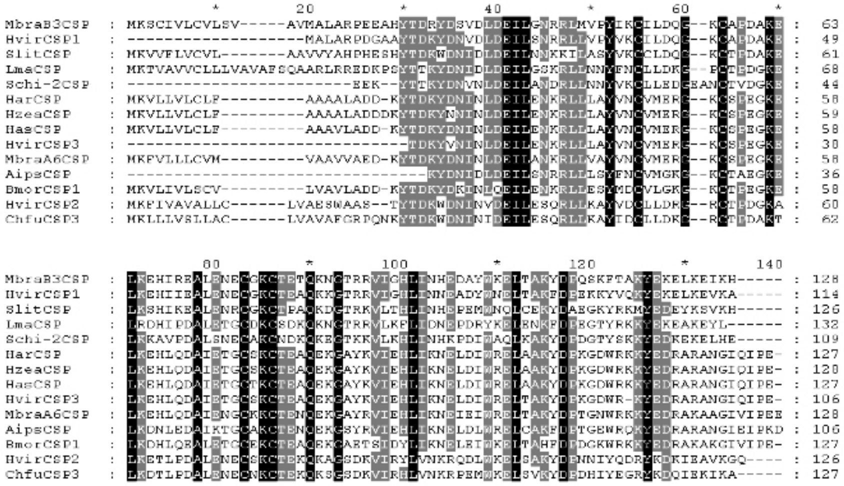


图 3　烟实夜蛾化学感受蛋白(CSP)与其同源蛋白氨基酸序列的多重联配

Fig. 3　Multiple alignment of amino acid sequences of chemosensory protein (CSP) of *Helicoverpa assulta* and its homologues from other CSPs

MbraB3CSP：甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*, GenBank accession no. AF255919；HvirCSP1：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, AY101512；SlitCSP：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*, DQ007458；LmaCSP：佛罗里达蟑螂 *Leucophaea maderae*, AY116616；Schi-2CSP：非洲沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*, AF070961；HarCSP：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AF368375；HzeaCSP：谷实夜蛾 *Helicoverpa zea*, AF448448；HasCSP：烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta*, DQ285667；HvirCSP-3：烟芽夜蛾 *H. virescens*, AY101513；MbraA6CSP：甘蓝夜蛾 *M. brassicae*, AF255918；AipsCSP：小地老虎 *Agrotis ipsilon*, AY301978；BmorCSP1：家蚕 *Bombyx mori*, AF509239；HvirCSP2：烟芽夜蛾 *H. virescens*, AY101511；ChfuCSP3：枞色卷蛾 *Choristoneura fumiferana*, AY426540. 下同 The same below.

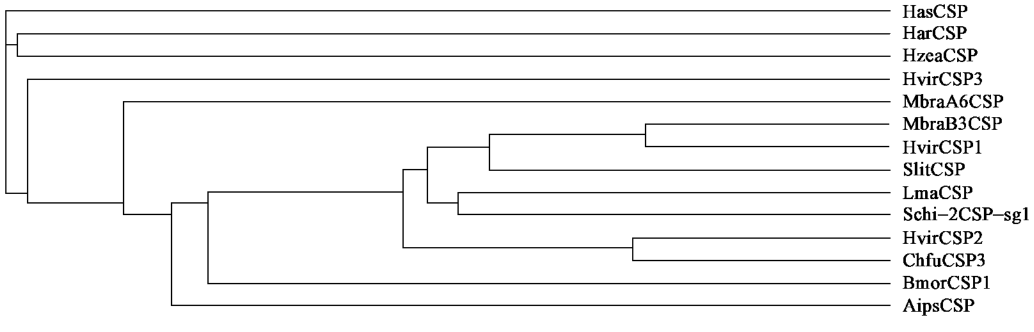


图 4　烟实夜蛾与其他昆虫化学感受蛋白氨基酸的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree based on amino acid sequences of the reported chemosensory proteins of insects

2.3　烟实夜蛾化学感受蛋白基因原核表达载体的构建

克隆载体 pGEM-T/Has-CSP 经 *Xho* Ⅰ和 *Bam*HⅠ双酶切后，回收 400 bp 大小的片段，与经同样酶切的原核表达载体 pGEX-4T$_2$ 连接。转化大肠杆菌 JM109，提取质粒 DNA，双酶切鉴定结果得到与预期大小相符的酶切片段，说明原核表达载体构建成功。

2.4　烟实夜蛾化学感受蛋白基因在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的重组质粒 pGEX-4T$_2$/Has-CSP 转化的 BL21 菌，经不同浓度的 IPTG 诱导后，可产生 40 kD 左右的特异性蛋白质条带，经 IPTG 诱导后表达

载体 pGEX-4T$_2$（阳性对照）可产生 26 kD 大小的蛋白条带，而 BL21 工程菌（阴性对照）则没有相应的条带（图 5：A）。为了进一步检测表达产物是不是含有 GST 的融合蛋白，以鼠抗 GST 为一抗，以辣根过氧化酶标记的羊抗鼠为二抗，对表达产物进行 Western 印迹分析，结果表明，pGEX-4T$_2$/Has-CSP 经 IPTG 诱导产生的 38.9 kD 蛋白条带与 GST 抗体发生很强的交叉反应，表明融合蛋白得到了表达（图 5：B）。

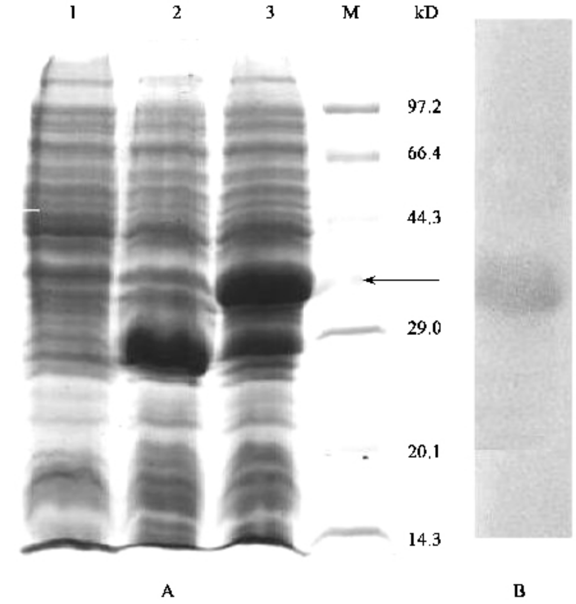


图 5 烟实夜蛾化学感受蛋白基因表达产物的 SDS-PAGE 分析（A）和 Western blot 鉴定（B）

Fig. 5 SDS-PAGE analysis (A) and Western blot analysis (B) of the expressed product of pGEX-4T$_2$/Has-CSP

M：标准分子量 Molecular weight marker；1：BL21 对照 *E. coli* BL21；2：pGEX-4T$_2$ 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T$_2$；3：pGEX-4T$_2$/Has-CSP 表达产物 Expressed product of pGEX-4T$_2$/Has-CSP.

2.5 表达蛋白的可溶性检测

大肠杆菌诱导产物经溶菌酶溶解后，分别对上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析发现，融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中（图 6），上清液中没有目的蛋白。

3 讨论

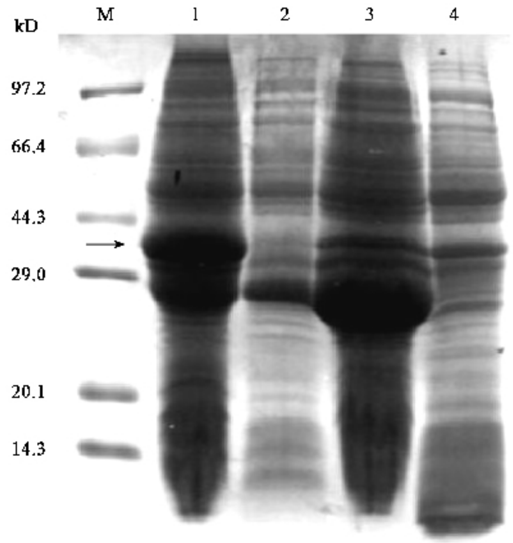


图 6 表达蛋白的可溶性检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the distribution of the expressed product for pGEX-4T$_2$/Has-CSP protein treated with lysozyme

M. 标准分子量 Molecular weight marker；1. 经溶酶菌处理过的沉淀 Insoluble protein treated with lysozyme；2. 经溶酶菌处理过的上清液 Soluble protein treated with lysozyme；3. pGEX-4T$_2$ 转化 BL21 的表达产物 Expressed product of pGEX-4T$_2$；4. BL21 对照 *E. coli* BL21 (CK).

本实验利用 RT-PCR 技术从烟实夜蛾触角中获得了编码化学感受蛋白基因的全长 cDNA，并进一步将其克隆到表达载体 pGEX-4T$_2$，转入大肠杆菌 BL21 进行表达。重组质粒 pGEX-4T$_2$/Has-CSP 经 IPTG 诱导后，表达出一个 39 kD 左右的重组蛋白，经 Western 印迹分析表明，所得蛋白为 GST 和 CSP 的融合蛋白，并且融合蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中。比较烟实夜蛾与其他昆虫化学感受蛋白的氨基酸序列发现，它与棉铃虫和谷实夜蛾的一致性高达 98%，但棉铃虫和谷实夜蛾化学感受蛋白的氨基酸序列更近似。从表达的结果看，烟实夜蛾化学感受蛋白基因在大肠杆菌中的表达量很高，但不同组织中的表达量是否相同还有待于研究。

在长期进化过程中，昆虫不仅形成气味（包括性信息素和普通气味）感受器官和气味结合蛋白，而且形成了化学感受器官和化学感受蛋白，使昆虫能够感受气味结合蛋白所不能接受的化学刺激，使受体神经启动相应控制机制，做出相应行为，避免受到长期持续的刺激或中毒死亡。昆虫化学感受蛋白与气味分子结合蛋白共同维护着昆虫对环境的适应。目前的研究结果表明，昆虫化学感受蛋白均为单体，都没有翻译后修饰（Angeli *et al*., 1999；Marchese *et al*., 2000；Campanacci *et al*., 2001a，2001b；Picone *et al*., 2001）。但气味结合蛋白多数为二聚体，有翻译后修饰（Paolini *et al*., 1998）。

昆虫化学感受蛋白的表达分布部位较为广泛，如从蟑螂足上能分离出与表皮生长有关的 *PameP*10

基因,这些结果能够帮助人们解释为什么通常能在一些表面积很大的器官中如触角、足和翅中发现化学感受蛋白。另外,化学感受蛋白基因也能对昆虫的免疫反应有一定的作用（Wanner *et al*.，2005）。也有报道,枞色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 中存在 4 种化学感受蛋白基因,且在昆虫的不同发育期表达水平也存在差异,但目前发育过程中的昆虫组织中化学感受蛋白的功能还不清楚。在对体外和配合物结合的研究表明,化学感受蛋白能结合大量的化学物质。来自于甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 的化学感受蛋白通常能与 14 ~ 18 碳的脂肪酸衍生物结合（Briand *et al*.，2002；Lartigue *et al*.，2002）。昆虫气味结合蛋白则主要在触角嗅觉神经元周围的淋巴液特异性的表达,极少数也可能在其他部位表达(李正西和 Zhou,2004),其中,性信息素结合蛋白主要存在于雄虫触角毛形感受器（Vogt *et al*.，2002）,少数种类的雌虫毛形感受器中性信息素结合蛋白也有很高的表达量（Callahan *et al*.，2000）；普通气味结合蛋白在雌雄虫触角锥形感受器都有表达分布(巩中军,2005)。本研究表明,烟实夜蛾化学感受蛋白不仅能在触角中表达,在下唇须及幼虫头部都有所表达,但烟实夜蛾化学感受蛋白在昆虫的不同发育期是否表达以及表达水平是否存在差异还有待于今后进一步研究。

传统上认为,昆虫忌避活性是昆虫嗅觉系统‘感受’到植物次生物质或外界施用物质的‘气味’而产生相应的规避行为,作用机理属于典型的‘气味结合型”（Foster and Harris，1997）。这些理论可以圆满解释小分子挥发性物质作用特点。然而,国内外大量研究证实诸多非挥发性、分子量较大的植物次生物质具有明显的产卵规避作用（Loon，1996；钟国华等,2000）,其作用机理用‘气味结合型’理论很难解释。有人认为印楝素、闹羊花素等非挥发性物质的规避作用(包括产卵忌避和行为忌避)属于‘接触型”忌避作用,其作用靶标可能就是昆虫跗节或触角化学感受器的化学感受蛋白。昆虫化学感受蛋白的研究结果为解释此类问题提供了新思路,对于研究开发基于昆虫化学感受分子作用机制的‘昆虫行为调节剂”,开拓农药创制的新领域,亦具有重要的理论和实践意义。

参 考 文 献（References）

Angeli S，Ceron F，Sealoni A，Monti M，Monteforti G，Minnocei A，Petaeehi R，Pelosi P，1999. Purification，structural characterization：cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur*. *J*. *Biochem*.，262：745 – 754.

Ban L，Scaloni A，Brandazza A，Angeli S，Zhang L，Yan Y，Pelosi P，2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol*. *Biol*.，12：125 – 134.

Ban L，Zhang L，Yan Y，Pelosi P，2002. Binding properties of a locust ’s chemosensory protein. *Biochem*. *Biophys*. *Res*. *Commun*.，293（1）：50 – 54.

Briand L，Swasdipan N，Nespoulous C，Bezirard V，Blon F，Huet JC，Ebert P，Pemollet JC，2002. Characterization of a chemosensory protein（ASP3c）from honeybee（*Apis mellifera*）as a brood pheromone carrier. *Eur*. *J*. *Biochem*.，269（18）：4 586 – 4 596.

Callahan FE，Vogt RG，Tucker ML，Dickens JC，Matto AK，2000. High level expression of“ male specific ”pheromone binding proteins（PBPs）in the antennae of female noctuiid moths. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*.，30：507 – 514.

Campanacci V，Mosbah A，Bornet O，Wechselberger R，Jacquin-Joly E，Cambillau C，Darbon H，Tegoni M，2001a. Chemosensory protein from the moth *Mamestra brassicae*：Expression and secondary structure from 1H and 15N NMR. *Eur*. *J*. *Biochem*.，268（17）：4 731 – 4 739.

Campanacci V，Spinelli S，Lartigue A，Lewandowsky C，Brown K，Tegoni M，Cambillau C，2001b. Recombinant chemosensory protein（CSP2）from the moth *Mamestra brassicae*：Crystallization and preliminary crystallographic study. *Acta Crystallographica*，D57：137 – 139.

Foster SP，Harris MO，1997. Behavioral manipulation methods for insect pest management. *Annu*. *Rev*. *Entomol*.，42：123 – 126.

Gong ZJ，Yuan GH，Guo XR，An SH，2005. Cloning and sequencing of cDNA encoding general odorant binding protein Ⅱ in the antenna of *Helicoverpa assulta* and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomol*. *Sin*.，48（1）：18 – 23.［巩中军,原国辉,郭线茹,安世恒,2005. 烟实夜蛾普通气味结合蛋白 Ⅱ cDNA 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达. 昆虫学报,48（1）：18 – 23］

Li ZX，Zhou JJ，2004. Cloning，identification and expression profiling of the cDNAs of odorant binding proteins in the malaria mosquito，*Anopheles gambiae*. *Acta Entomol*. *Sin*.，47（4）：417 – 423.［李正西,Zhou JJ,2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报,47（4）：417 – 423］

Liu JX，Zhong GH，Xie JJ，Guan S，Hu MY，2005. Recent advances in chemosensory proteins of insects. *Acta Entomol*. *Sin*.，48（3）：418 – 426.［刘金香,钟国华,谢建军,官珊,胡美英,2005. 昆虫化学感受蛋白研究进展. 昆虫学报,48（3）：418 – 426］

Lartigue A，Campanacci V，Roussel A，Larsson AM，Jones TA，Tegoni M，Cambillau C，2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *J*. *Biol*. *Chem*.，277（35）：32 094 – 32 098.

Marchese S，Angeli S，Andolfo A，Scaoni A，Brandazza A，Mazza M，Picimbon JF，Leal WS，Pelosi P，2000. Soluble proteins from chemosensory organs of *Eurycantha calcarata*（Insecta：Phasmatodea）. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*.，30：1 091 – 1 098.

Pilpel Y，Lancet D，1999. Olfaction：Good reception in fruitfly antennae. *Nature*，398：285 – 287.

Paolini S，Scaloni A，Amoresano A，Marchese S，Napolitano E，Pelosi P，1998. Amino acid sequence，post-translational modifications，binding

and labelling of porcine odorant binding protein. *Chem. Senses*, 23: 689－698.

Picone D, Crescenzi O, Angeli S, Marchese S, Brandazza A, Ferrara L, Pelosi P, Scaloni A, 2001. Bacterial expression and conformational analysis of a chemosensory protein from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem.*, 268: 4 794－4 801.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

van Loon JJA, 1996. Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: A glance at the periphery. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 7－13.

Vogt RG, Rogers ME, Franco MD, Sun M, 2002. A comparative study of odorant binding protein genes: Differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *J. Exp. Biol.*, 205: 719－744.

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insects. *Acta Entomol. Sin.*, 45(1): 131－137. [**王桂荣,郭予元,吴孔明**,2002. **昆虫触角气味结合蛋白的研究进展**. **昆虫学报**,45(1): 131－137]

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2005. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding chemosensory protein in *Helicoverpa armigera*. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(11): 2 233－2 239. [**王桂荣,吴孔明,郭予元**,2005. **编码棉铃虫化学感受蛋白** cDNA **的克隆及序列分析**. **中国农业科学**,38(11): 2 233－2 239]

Wang HL, Zhao CH, Wang CZ, 2005. Comparative study of sex pheromone composition and biosynthesis in *Helicoverpa armigera*, *H. assulta* and their hybrids. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 575－583.

Wanner KW, Willis LG, Theilmann DA, lsman MB, Feng QL, Plettner E, 2004. Analysis of the insect OS-D-like gene family. *J. Chem. Ecol.*, 30(5): 889－911.

Zhong GH, Hu MY, Zhang YP, Zhou XM, 2000. Studies on extracts of *Rhododendron molle* as oviposition deterrentants and ovicides against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *J. South China Agric. Univ.*, 21(3): 40－44. [**钟国华,胡美英,章玉苹,周晓梅**, 2000. **黄杜鹃提取物对小菜蛾的产卵忌避和杀卵作用**. **华南农业大学学报**,21(3): 40－44]

(**责任编辑:黄玲巧**)